

TESIS DOCTORAL

EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO COMO ESTRATEGIA
QUIRÚRGICA ÚTIL EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO CON
INJERTO DE TAMAÑO REDUCIDO



Rosa Franco Gou

Universidad de Barcelona
Departamento de Fisiología Animal
2006

Programa de Doctorado de Fisiología

Bienio 2002-2004

**EL PRECONDICIONAMIENTO ISQUÉMICO COMO ESTRATEGIA
QUIRÚRGICA ÚTIL EN EL TRASPLANTE HEPÁTICO CON
INJERTO DE TAMAÑO REDUCIDO**

Tesis Doctoral presentada por Rosa Franco Gou para optar al Título de Doctora
por la Universidad de Barcelona

Directores: Dra. Carmen Peralta Uroz

Dr. Joan Roselló Catafau

Tutora: Dra. Teresa Carbonell

Barcelona, marzo 2006

A MI FAMILIA

A mis directores de tesis, la Dra. Carmen Peralta, por haber confiado en mi, por tener paciencia y por haberme enseñado tantas cosas (no sólo a nivel profesional) y al Dr. Joan Roselló, por haberme recibido con los brazos abiertos en el grupo y por apoyarme hasta el final.

Al Dr. Ramón Bartrons por presentarme al Dr. Joan Roselló aquel día en Bellvitge y al personal de su grupo por la ayuda prestada.

Al Dr. Luís Grande, por permitirme asistir a una operación quirúrgica.

A los miembros del tribunal por acceder a evaluar la presente tesis doctoral.

Al profesor Emili Gelpí, Director del IIBB, por haberme aceptado como becaria en el IIBB.

A la Dra. Teresa Carbonell, por haber aceptado la tutoría de esta tesis.

A la Marató de TV3 y al Ministerio de Educación y Ciencia por las becas recibidas.

Al personal del estabulario de la Facultad de Medicina, por ayudarme en todo el tiempo que he pasado allí. Y claro, no puedo olvidarme de las ratitas, que han sufrido esta tesis en sus carnesj.

A la Dra. Leticia Fernández, por haber sido mi maestra en el laboratorio y en el estabulario y por estar siempre dispuesta a ayudarme.

A la Dra. Anna Serafín por haber realizado los análisis histológicos.

A la Massipa, mi compañera, por todas esas risas, por esos westerns y esos revelados en la sala oscura. Y a la seva filla, la Martina, que también trabajó unos meses a mi lado, je, jej

Araní, mi otra compañera, gracias por haberme ayudado en el laboratorio, por escucharme y darme ánimos y buenos consejos. Por esos ratos pasados en Madrid.

A Ismail, por portarse tan bien en el congreso de Túnez, por ayudarme siempre que lo he necesitado.

A los nuevos componentes del grupo. A Izabel, por llegar con tan buena onda. A Fernando y Amin.

A los compañeros y compañeras del laboratorio que ya se fueron, Txell, Magda, Susana, Esther. Y a los que están ahora, Emma, Ángeles, Jose, Anna Serrano, Michaela, Maria, Gemma, Patricia, Eugenia, Xavi, Joan, Fran, Anna Fernández, Maite, Miguel, Ignasi, por haber hecho tan agradable trabajar a su lado.

A la Carme Xaus, per ajudar-me quan l'he necessitat.

Als companys del despatxet, l'Emma, l'Anna i el Jose, que si quito el aire, que si lo pongo, que si sube la persiana, que si como va el encabezado y el pie de página.....Ay, Jose; quien leerá primero?. Emma, ens ho hem passat be, oi?

A los técnicos de histología, M^a Ángeles, Olga y Nacho.

A los compañeros de la sexta planta, por esas comidas compartidas en la cantina, esas pocas cenas y algunas cervezas. He estado muy a gusto.

Al arte de la Capoeira , por ayudarme a crecer.

A tots els mestres que han contribuït a formar el meu interès per la Biologia. La Marina Mir i la Carol a l'institut. I uns quants professors de la carrera.

A l'Albertus, que ha estat molt agradable estar amb ell tan de temps.

A mis amigas de la infancia, la Melinda y la Mónica por haber estado siempre cerca. A los coleguillas del parque grande y del pasaje Jaime Roig. A la Elisa por animarme a vivir día a día. A la Bárbara por haber compartido tanto. A l'Esther, encara que estigui lluny.

Als amics de la Facultat de Biologia, la Tana, la Magdala, el Marc, la Fanny, l'Ares, la Gina, el Feliu, el Pep, el Tomás, la Bàrbara, el Xavi, la Marta, l'Eva, la Sílvia, la Alexandra, la Mireia, el Llorenç, el Ramonet, la Txell.....Tinc molt bon record d'aquella etapa a la facultat. Per les hores passades al Monolito, per aquells sopars els dimecres a Rius i Taulet i per les trobades que fem de tant en tant.

Als companys de Bioquímica, l'Esther G., l'Ivan, el Lluís, l'Esther S..... per les xerrades transcendents i tantes rialles.....

Als Fortadors, les Ànimes i la Família Rústika, por compartir tantas fiestas, excursiones, reuniones, tardes de domingo,..... y qué durej. A los amigos del Duplex, de la Mansión, del local y del nichito de amor. A la Lorena para que sea valiente. Al Pedrito por ser tan majo. A la Bea y al Naco por enseñarme la montaña.

Con mucho cariño, al Dani, por quererme tal como soy, por estar conmigo en los momentos buenos y en los malos y por haber vivido tanto juntos. Y a su familia, por portarse tan bien conmigo.

Y sobre todo, esta tesis se la dedico a mi familia, que es la mejor del mundo. Moltes gràcies. A mis padres, Juan y Magda, por su apoyo incondicional, porque todo lo que soy se lo debo a ellos A mi hermano Kilian por ser tan guapo y darlo todo por ayudarme y a mi querida hermana Raquel por escucharme, apoyarme y siempre estar a mi lado. A l'Àvia y a la Abuela; qué sembra que ja acabo d'estudiar, avieta;

A todos aquellos que no he mencionado y que en algún momento han estado a mi lado.

Gracias por todo.



ÍNDICE

1.Introducción	17
1.1.Generalidades.....	19
1.2.Trasplante hepático.....	20
1.2.1.Cirugía del donante.....	21
1.2.2.Cirugía del receptor.....	22
1.3.Síndrome de isquemia/reperfusión.....	22
1.3.1.Introducción.....	22
1.3.2.Relevancia quirúrgica.....	22
1.3.3.Disfunción primaria del injerto.....	23
1.4.Estrategias para aumentar el número de injertos.....	24
1.5.Trasplante hepático de tamaño reducido.....	25
1.5.1.Trasplante hepático de tamaño reducido cadavérico.....	26
1.5.2.Trasplante hepático Split	27
1.5.3.Trasplante hepático de donante vivo.....	28
1.6.Regeneración hepática.....	29
1.6.1.Factor de crecimiento hepatocitario.....	31
1.6.2.Factor de crecimiento transformante-β.....	32
1.7. Factores implicados en el síndrome de isquemia-reperfusión que pueden afectar a la regeneración.....	33
1.7.1.Introducción.....	33
1.7.2.Nucleótidos de adenina.....	33
1.7.3.Radicales libres de oxígeno.....	34
1.7.4.Neutrófilos.....	36
1.7.5.Células de kupffer.....	36
1.7.6.Citoquinas (TNF-α, IL-1 y IL-6).....	37
1.7.7.Óxido nítrico.....	39
1.8. Lesión pulmonar asociada al trasplante hepático.....	40
1.8.1.introducción.....	40
1.8.2.IL-1 y daño pulmonar.....	41
1.8.3.TNF-α y sus receptores solubles en el daño pulmonar.....	41
1.9. Precondicionamiento isquémico.....	42
1.9.1.Vías de señalización molecular.....	43
1.9.2.Adenosina y óxido nítrico.....	45
1.9.3.Metabolismo energético.....	46
1.9.4.Neutrófilos y alteraciones en la microcirculación.....	46

1.9.5.Estrés oxidativo y citoquinas.....	47
1.9.6..Precondicionamiento isquémico y daño pulmonar.....	48
1.9.7.Aplicación clínica del precondicionamiento isquémico.....	48
2.Objetivos.....	51
2.1.Primer estudio.....	54
2.2.Segundo estudio.....	55
2.3.Tercer estudio.....	56
3.Material y métodos.....	57
3.1.Animales de experimentación.....	59
3.2.Modelo experimental: Trasplante hepático ortotópico con injerto de tamaño reducido.....	59
3.2.1.Anestesia.....	59
3.2.2.Técnica quirúrgica.....	59
Cirugía del donante.....	59
Cirugía de banco.....	61
Cirugía del receptor.....	62
Precondicionamiento isquémico.....	64
3.3.Recogida y procesamiento de las muestras.....	64
3.4.Grupos experimentales.....	64
3.4.1.Primer estudio.....	64
3.4.2.Segundo estudio.....	69
3.4.3.Tercer estudio.....	73
3.5.Determinaciones bioquímicas.....	74
3.5.1.Transaminasas.....	74
3.5.2.Peroxidación lipídica.....	74
Determinación de malondialdehído.....	74
Determinación de hidroperóxidos lipídicos.....	75
Peróxido de hidrógeno.....	75
3.5.3.Mieloperoxidasa.....	76
3.5.4.Actividad Xantina deshidrogenasa/xantina oxidasa.....	76
3.5.5.Nucleótidos de adenina, hipoxantina y xantina.....	76
3.5.6.Nitritos y nitratos.....	77
3.5.7.Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α).....	77
3.5.8.Receptores solubles de TNF- α	78
3.5.9.Interleuquina-6 (IL-6).....	78
3.5.10..Factores de crecimiento (HGF y TGF- β).....	78
3.5.11.Interleuquina-1 (IL-1).....	79

3.5.12. Proteínas.....	79
3.6. Técnicas de biología molecular.....	80
3.6.1. Western blot para las proteínas del shock térmico.....	80
3.6.2. PCR a tiempo real para la IL-1 α	81
3.7. Técnicas histológicas.....	81
3.7.1. Inmunohistoquímica de PCNA.....	81
3.7.2. Estudio histológico con H&E.....	82
3.8. Estudio estadístico.....	83
4. Resultados.....	85
4.1. Primer estudio.....	87
4.2. Segundo estudio.....	101
4.3. Tercer estudio.....	114
5. Discusión.....	143
5.1. Primer estudio.....	145
5.2. Segundo estudio.....	147
5.3. Tercer estudio.....	150
6. Conclusiones.....	153
7. Bibliografía.....	157
8. Anexo.....	181

ABREVIATURAS

ALT	Alanina amino transferasa
AMPK	Proteína quinasa dependiente de AMP
AST	Aspartato amino transferasa
DPI	Disfunción primaria del injerto
ET	Endotelina
FPI	Fallo primario del injerto
GdCl₃	Cloruro de gadolinio
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HES	Hidroxyethyl starch
HGF	Factor de crecimiento hepatocitario
HO-1	Hemo-oxigenasa-1
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
HSPs	Proteínas del shock térmico
IL-1	Interleuquina-1
IL-1ra	Antagonista del receptor de IL-1
IL-6	Interleuquina-6
I/R	Isquemia/reperfusión
LPO	Hidroperóxidos lipídicos
LAP	Péptido asociado a la latencia
MDA	Malonildialdehido
MPO	Mieloperoxidasa
NAME	N ω -nitro-L-Arginine-methyl-ester
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
PC	Precondicionamiento isquémico
PCNA	Antígeno nuclear de proliferación celular
RLO	Radicales libres de oxígeno
RSHT	Trasplante hepático de tamaño reducido
SOD	Superóxido dismutasa
STNFR	Receptor soluble de TNF- α
TNF-α	Factor de necrosis tumoral- α
TGF-β	Factor de crecimiento transformante- β

TNFR	Receptor de TNF- α
UW	Solución de la Universidad de Wisconsin
XDH	Xantina deshidrogenasa
XOD	Xantina oxidasa